

Motilitas Spermatozoa Sapi Limousin dalam Pengencer CEP-D dengan Penambahan Serum Darah Sapi sebagai Alternatif Pengganti Bovine Serum Albumin

Limousin Bull Sperm Motility in CEP-D Diluent with Addition of Cattle Blood Serum as Replacement of Bovine Serum Albumin

Rina Aisyah Puspitasari*, Nur Ducha, Erlix Rakhmad Purnama

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Universitas Negeri Surabaya

* e-mail: rina.puspitasari.2@gmail.com

ABSTRAK

Penyimpanan semen pada nitrogen cair dapat menyebabkan penurunan motilitas spermatozoa yang disebabkan oleh *cold shock* atau radikal bebas, oleh karena itu dalam pengencer dibutuhkan krioprotektan untuk melindungi spermatozoa, salah satunya adalah serum darah sapi. Tujuan penelitian ini adalah membuktikan bahwa serum darah sapi dapat menggantikan fungsi BSA sebagai krioprotektan dalam pengencer CEP-D untuk mempertahankan motilitas spermatozoa. Desain penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap yang terdiri atas 6 perlakuan dan 4 pengulangan, yaitu K (serum darah 0%), P1 (serum darah 2%), P2 (serum darah 3%), P3 (serum darah 5%), P4 (serum darah 7%), dan perlakuan (BSA) sebagai kontrol positif. Semen segar dengan motilitas $\geq 70\%$ diencerkan, kemudian dilakukan proses *filling and sealing*, *prefreezing*, *freezing*, dan *thawing*. Parameter yang diukur adalah persentase motilitas spermatozoa dengan melihat pergerakan spermatozoa progresif. Motilitas spermatozoa diamati menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x pada *slide warmer* bersuhu 37°C oleh 2 orang. Data dianalisis menggunakan uji Anova satu arah dan uji Duncan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan P3 (serum 5%) tidak berbeda nyata dengan kontrol positif. Persentase motilitas P3 *before freezing* dan *pasca thawing* adalah $58,13\% \pm 1,39$ dan $33,13\% \pm 2,32$. Simpulan dari penelitian ini adalah serum darah sapi 5% dalam pengencer CEP-D dapat menggantikan fungsi BSA untuk mempertahankan motilitas spermatozoa sapi Limousin (*Bos taurus*).

Kata kunci: motilitas spermatozoa; serum darah sapi; pengencer CEP-D; BSA; sapi Limousin.

ABSTRACT

The storage process of sperm in liquid nitrogen can decrease sperm motility because of cold shock or free radicals, therefore in diluent need cryoprotectants to protection for spermatozoa, which is cattle blood serum. The aim of this study was to prove that cattle blood serum can replacement the function of BSA as cryoprotectant in CEP-D diluent for defend sperm with motility. The research design was a completely randomized design which was composed of 6 treatments and 4 replications, those were K (blood serum 0%), P1 (blood serum 2%), P2 (blood serum 3%), P3 (blood serum 5%), P4 (blood serum 7%), and BSA treatment as controls positive. Fresh semen with motility 70% was diluted, than the process of filling and sealing, prefreezing, freezing, and thawing. Parameters measured were the percentage of sperm motility was observed with progressive movement of spermatozoa. Sperm motility was observed using a light microscope with 400x magnification on slide warmer at temperature of 37°C by 2 persons. Data were analyzed using one-way ANOVA test and Duncan test. The results showed that P3 treatment have not a difference obvious with controls positive. The percentage of motility P3 *before freezing* dan *pasca thawing* were $58.13\% \pm 1.39$ and $33.13\% \pm 2.32$. The conclusion of this study was cattle blood serum 5% in CEP-D diluent can continue as a replacement the function of BSA for defend Limousin bull (*Bos taurus*) sperm motility.

Key words: sperm motility; cattle blood serum; CEP-D diluent; BSA; Limousin bull.

PENDAHULUAN

Proses penyimpanan spermatozoa pada nitrogen cair dapat menurunkan motilitas spermatozoa yang disebabkan oleh *cold shock* atau

radikal bebas. Penurunan motilitas spermatozoa terjadi karena perubahan struktur dan fisiologis pada spermatozoa tersebut (Munoz, *et al.*, 2011). *Cold shock* dapat terjadi akibat perubahan fase

lipid sehingga menyebabkan susunan lipid pada membran spermatozoa berubah (Ducha, dkk., 2013). Selain itu pada proses pembekuan semen juga terjadi kerusakan membran plasma spermatozoa karena peroksidasi lipid (Herdis, 2005) yang dapat mengakibatkan kematian bagi spermatozoa. Peroksidasi lipid terjadi akibat adanya radikal bebas yaitu senyawa yang memiliki elektron tidak berpasangan dan bersifat sangat reaktif (Rizal dan Herdis, 2010), sehingga dibutuhkan bahan pengencer yang dapat melindungi membran spermatozoa selama penyimpanan (Ducha, 2014).

Salah satu pengencer yang dapat digunakan untuk penyimpanan semen sapi adalah pengencer *Cauda Epididymal Plasma-D* (CEP-D). Pengencer CEP-D merupakan pengencer *Cauda Epididymal Plasma-2* (CEP-2) yang telah dimodifikasi oleh Duchá, *et al.*, (2012) dengan modifikasi metode pembuatan, antibiotik dan konsentrasi kuning telur yang berbeda dengan pengencer CEP-2 yang dilakukan oleh Verberckmoes, *et al.*, (2004). Selain itu di dalam pengencer juga perlu ditambahkan bahan yang berfungsi sebagai krioprotektan ekstraseluler (Ducha, 2014).

Bovine Serum Albumin (BSA) merupakan protein serum albumin sapi yang menjadi salah satu komponen pada CEP-D dan berfungsi sebagai makromolekul dalam pengencer untuk melindungi spermatozoa selama penyimpanan (Ducha, *et al.*, 2012). *Bovine Serum Albumin* merupakan produk impor yang harganya sangat mahal dan sulit didapatkan sehingga dibutuhkan alternatif pengganti BSA yang harganya lebih murah dan mudah didapatkan yaitu dengan serum darah sapi. Serum darah sapi mengandung komponen yang sama dengan komponen yang ada di dalam BSA yaitu protein albumin. Protein albumin kemungkinan dapat melindungi membran plasma dari luar sehingga tidak terjadi kontak antara membran plasma dengan ROS (Zhang, *et al.*, 2015).

Berdasarkan uraian tersebut, tujuan penelitian ini adalah membuktikan bahwa serum darah sapi dapat menggantikan fungsi BSA sebagai krioprotektan dalam pengencer CEP-D untuk mempertahankan motilitas spermatozoa sapi Limousin.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilakukan pada bulan April-Mei 2017 di Laboratorium Kultur Jaringan, Universitas Negeri Surabaya dan di Laboratorium Teaching Farm, Universitas Airlangga. Pembuatan pengencer CEP-D tanpa BSA terdiri

atas NaCl 15 mmol/l; NaHCO₃ 11,9 mmol/l; KCl 7 mmol/l; NaH₂PO₄ 8 mmol/l; CaCl₂(H₂O)₂ 3 mmol/l; fruktosa 55 mmol/l; MgCl₂(H₂O)₆ 3 mmol/l; KH₂PO₄ 20 mmol/l; tris 133,7 mmol/l; penisilin 1000 IU; streptomisin 1 g; sorbitol 1 g/l; asam sitrat 42,6 mmol/l yang dihomogenkan dengan *deionized water* steril, kemudian ditambahkan kuning telur ayam sebanyak 20% dan serum darah sapi dengan konsentrasi yang berbeda. Pembuatan pengencer CEP-D dengan BSA juga dilakukan sebagai perlakuan kontrol positif.

Semen yang digunakan pada penelitian ini adalah semen sapi Limousin yang berasal dari Teaching Farm Universitas Airlangga. Sebelum dilakukan proses pengenceran dan pembekuan, terlebih dahulu dilakukan pengujian semen segar sapi Limousin meliputi volume, warna, bau, pH, konsistensi, konsentrasi, motilitas massa dan motilitas individu. Semen yang digunakan adalah semen yang telah memenuhi SNI untuk IB yaitu motilitas massa 2+ dan motilitas individu $\geq 70\%$.

Proses pembekuan semen diawali dengan pengenceran semen segar sapi Limousin dengan motilitas $\geq 70\%$ menggunakan pengencer CEP-D yang telah disuplementasi kuning telur 20% dan serum darah sapi dengan konsentrasi berbeda. Kemudian dilakukan proses *filling and sealing*. Selanjutnya dilakukan proses *prefreezing* dan *freezing*. Setelah 3 hari penyimpanan dilakukan proses *thawing* dan dilanjutkan dengan pengamatan motilitas spermatozoa sapi Limousin.

Parameter yang diukur adalah motilitas spermatozoa sapi Limousin. Metode pengamatan motilitas spermatozoa yaitu dengan cara semen diambil menggunakan mikropipet kemudian ditetaskan pada gelas objek dan ditutup dengan cover. Pengamatan motilitas spermatozoa dilakukan di atas *slide warmer* bersuhu 37°C dan diamati menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x oleh 2 orang.

Desain penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap yang terdiri atas 6 perlakuan dan 4 pengulangan, yaitu K (serum darah 0%), P1 (serum darah 2%), P2 (serum darah 3%), P3 (serum darah 5%), P4 (serum darah 7%), dan perlakuan (BSA) sebagai kontrol positif. Parameter yang diukur adalah persentase motilitas spermatozoa.

Data hasil pengamatan adalah persentase motilitas spermatozoa yang kemudian ditransformasi dalam *arcsin*. Selanjutnya dilakukan uji normalitas, kemudian dianalisis dengan uji Anova satu arah. Setelah itu dilanjutkan uji Duncan untuk mengetahui perbedaan masing-masing perlakuan.

Perhitungan statistik dilakukan dengan SPSS 23.0 for windows.

HASIL

Motilitas merupakan pergerakan spermatozoa yang progresif maju ke depan (Susilawati, 2011). Hasil pemeriksaan semen segar sapi Limousin menunjukkan bahwa semen segar dapat dilanjutkan pada proses pengenceran dan pembekuan. Rerata persentase motilitas

spermatozoa *before freezing* dan *post thawing* yang terkecil adalah perlakuan Kontrol (serum darah 0%) sebesar $48,13\% \pm 2,16$ dan $2,71\% \pm 2,81$. Rerata persentase motilitas spermatozoa tertinggi saat *before freezing* adalah perlakuan P3 (serum darah 5%) sebesar $58,13\% \pm 1,39$. Rerata persentase motilitas spermatozoa *pasca thawing* tertinggi adalah perlakuan kontrol positif (BSA) sebesar $34,38\% \pm 0,76$.

Tabel 1. Rerata Persentase Motilitas±Standar Deviasi Spermatozoa Sapi Limousin (*Bos taurus*) dengan Konsentrasi Serum Darah Sapi yang Berbeda dalam Pengencer CEP-D.

Perlakuan	Motilitas Spermatozoa (%)	
	<i>Before Freezing</i>	<i>Freezing</i>
Kontrol (serum darah 0%)	$48,13 \pm 2,16^a$	$2,71 \pm 2,81^a$
P1 (serum darah 2%)	$53,13 \pm 0,72^b$	$13,13 \pm 2,08^b$
P2 (serum darah 3%)	$50,63 \pm 0,72^{ab}$	$18,75 \pm 1,06^c$
P3 (serum darah 5%)	$58,13 \pm 1,39^c$	$33,13 \pm 2,32^d$
P4 (serum darah 7%)	$53,75 \pm 0,83^b$	$18,13 \pm 1,81^c$
Kontrol positif (BSA)	$57,5 \pm 1,18^c$	$34,38 \pm 0,76^d$

Keterangan : a, b, c, d adalah notasi uji Duncan

Notasi uji Duncan menunjukkan bahwa pada saat pengamatan *before freezing*, perlakuan Kontrol (serum darah 0%) berbeda nyata dengan perlakuan P1 (serum darah 2%), P3 (serum darah 5%), P4 (serum darah 7%), Kontrol positif (BSA), dan tidak berbeda nyata dengan perlakuan P2 (serum darah 3%). Perlakuan P1 (serum darah 2%), P2 (serum darah 3%), dan P4 (serum darah 7%) tidak memiliki perbedaan yang nyata. Perlakuan P3 (serum darah 5%) tidak berbeda nyata dengan perlakuan kontrol positif (BSA). Sedangkan pada saat *post thawing* perlakuan kontrol (serum darah 0%) maupun perlakuan P1 (serum darah 2%) berbeda nyata dengan semua perlakuan. Perlakuan P2 (serum darah 3%) tidak berbeda nyata dengan perlakuan P4 (serum darah 7%). Perlakuan P3 (serum darah 5%) dengan perlakuan kontrol positif (BSA) juga tidak memiliki perbedaan yang nyata.

PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil diketahui bahwa rerata persentase motilitas spermatozoa pada perlakuan kontrol lebih rendah dibandingkan dengan perlakuan yang telah disuplementasi serum darah sapi atau BSA. Hal tersebut menunjukkan bahwa pada perlakuan kontrol tidak memiliki komponen yang berfungsi sebagai makromolekul dalam pengencer yang berasal dari protein serum albumin, sehingga selama proses pembekuan terjadi penurunan motilitas lebih besar. Perlakuan Kontrol positif (BSA) dan P3 (serum darah 5%) merupakan perlakuan paling optimal dalam

mempertahankan motilitas spermatozoa saat *before freezing* maupun *post thawing*. Hal tersebut menunjukkan bahwa adanya BSA atau serum darah sapi dalam pengencer CEP-D dapat berfungsi sebagai krioprotektan ekstraseluler yang dapat melindungi membran plasma spermatozoa dari luar selama proses penyimpanan (Ducha, 2014; Rizal dan Herdis, 2008).

Serum darah pada dasarnya adalah plasma darah tanpa fibrinogen dan faktor pembekuan (Saladine, *et al.*, 2008). Plasma darah adalah cairan berwarna kuning muda yang terdiri 91% air, 7% protein, dan 2% komponen lain seperti ion, nutrien, gas, elektrolit, dan hormon. Protein utama yang terkandung di dalamnya adalah albumin, globulin, dan fibrinogen (VanPutte, *et al.*, 2016). Albumin merupakan protein yang jumlahnya paling banyak yaitu sebesar 60% (Saladine, *et al.*, 2008).

Pada serum darah sapi mengandung komponen yang sama dengan BSA yaitu protein albumin, sehingga penambahan serum darah sapi dapat digunakan sebagai alternatif pengganti BSA dalam pengencer CEP-D. *Bovine Serum Albumin* ini berfungsi sebagai makromolekul dalam pengencer untuk melindungi spermatozoa dari kerusakan yang berlebihan selama proses pembekuan semen (Ducha, *et al.*, 2012; Rizal, dkk., 2013).

Bovine Serum Albumin dapat memberikan faktor menguntungkan bagi spermatozoa seperti memberikan energi substrat dan menjaga tekanan

osmotik pada kedua sisi membran plasma yaitu dengan cara menjaga keseimbangan ion dan molekul kecil (Sariozkan, *et al.*, 2013; Zhang, *et al.*, 2015). *Bovine Serum Albumin* tersebut akan terarbsorbsi pada membran spermatozoa dan menjaga keseimbangan ion Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , dan Mg^{2+} (Blank, 1976).

Selain itu, adanya BSA atau serum darah sapi dalam pengencer CEP-D mampu menurunkan peroksidasi lipid pada membran plasma yang disebabkan oleh ROS. Hidrogen peroksida dapat membentuk radikal bebas jika bereaksi dengan logam transisi seperti Fe^{2+} dan Cu^+ dalam reaksi Fenton (Winarsi, 2007). Protein albumin yang terkandung di dalam BSA atau serum menjadi penghubung transisi ion logam Fe^{2+} dan Cu^+ , sehingga dapat meminimalkan pembentukan OH-radikal yang menjadi promotor dari peroksidasi lipid spermatozoa (Perumal, *et al.*, 2015).

Kandungan protein albumin yang terlalu besar dalam pengencer dapat bersifat racun dan membahayakan spermatozoa (Perumal, *et al.*, 2015). Hal tersebut didukung dengan pernyataan Zhang, *et al.*, (2015) bahwa konsentrasi BSA yang berlebihan dapat menurunkan tekanan osmotik di luar sel sperma yang menyebabkan ion dan molekul kecil pada membran menjadi tidak seimbang dan menyebabkan H_2O masuk ke dalam sel sperma secara berlebihan, sehingga motilitas spermatozoa akan menurun.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa motilitas *post thawing* perlakuan P3 (serum darah 5%) dan perlakuan (BSA) sebagai kontrol positif belum mencapai 40%. Hal tersebut dapat terjadi akibat pemindahan *straw* pada kontainer lain yang menyebabkan sebagian *straw* mengkristal. Pemindahan *straw* pada kontainer yang lain menyebabkan penurunan motilitas spermatozoa *pasca thawing* karena spermatozoa mengalami *chold shock*.

SIMPULAN

Serum darah sapi 5% dalam pengencer CEP-D dapat menggantikan fungsi BSA untuk mempertahankan motilitas spermatozoa sapi Limousin (*Bos taurus*). Saran yang dapat diajukan yaitu perlu diadakan penelitian lebih lanjut untuk membandingkan pengaruh serum darah sapi dengan serum darah dari hewan lain dalam mempertahankan motilitas spermatozoa sapi Limousin.

DAFTAR PUSTAKA

- Blank M, Soo L, and Britten JS, 1976. Adsorption of Albumin on Rabbit Sperm Membranes. *Journal Membrane Biology*. 29: 401-409.
- Ducha N, Susilawati T, Aulanni'am, Wahyuningsih S, and Pangestu M, 2012. Ultrastructure and Fertilizing Ability of Limousin Bull Sperm After Storage in CEP-2 Extender With and Without Egg Yolk. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 15 (20): 979-985.
- Ducha N, Susilawati T, Aulanni'am, dan Wahyuningsih S, 2013. Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa Sapi Limousin Selama Penyimpanan Pada Refrigerator dalam Pengencer CEP-2 dengan Suplementasi Kuning Telur. *Jurnal Kedokteran Hewan*. 7 (1).
- Ducha N, 2014. The Effect of Skim Milk Addition in CEP-2 Diluent on Motility and Viability of Limousin Bull Sperm During Sorage at Refrigerator. *Proceeding of International Conference on Research and Education of Mathemathic and Science*.
- Herdis, 2005. *Optimalisasi Inseminasi Buatan Melalui Aplikasi Teknologi pada Domba Garut*. Bogor: Institut Pertanian Bogor Press.
- Munoz OV, Briand LA, Bencharif D, Anton M, Desherces S, Smitt E, Thorin C, and Tainturier D, 2011. Effect of Low-Density Lipoproteins, Spermatozoa Concentration and Glycerol on Functional and Motility Parameters of Bull Spermatozoa During Storage at 4°C. *Asian Journal of Andrology*. 13 (2): 281-286.
- Perumal P, Nahak AK, Vupru K, Khate K, Balamurugan TC, and Prakash KR, 2015. Effect of Addition of Bovine Serum Albumin on the Liquid Storage (5°C) of Mithun (*Bos frontalis*) Semen. *Journal of Cell and Tissue Research*. 15 (1): 4795-4800.
- Rizal M dan Herdis, 2008. *Inseminasi Buatan Pada Domba*. Jakarta: PT Rineka Cipta.
- Rizal M dan Herdis, 2010. Peranan Antioksidan dalam Meningkatkan Kualitas Semen Beku. *Jurnal Wartazoa*. 20 (3).

- Rizal M, Herdis, dan Insun S, 2013. Fetal Bovine Serum dalam Pengencer Tris Mempertahankan Kehidupan dan Keutuhan Membran Plasma Spermatozoa Semen Beko Domba Garut. *Jurnal Veteriner*. 14 (4): 437-443.
- Saladine KS, Stephen JS, and Christina AG, 2008. *Human Anatomy: Second Edition*. New York: McGraw-Hill Education.
- Sariozkan S, Gaffari T, Fazile C, Arzu Y, Eken A, and Akcay A, 2013. The Effect of Bovine Serum Albumin and Fetal Calf Serum on Sperm Quality, DNA Fragmentation and Lipid Peroxidation of the Liquid Stored Rabbit Semen. *Journal Cryobiology*. 67: 1-6.
- Susilawati T, 2011. *Spermatology*. Malang: Universitas Brawijaya Press.
- VanPutte C, Regan J, Russo A, Seeley RR, Stephens T, and Tate P, 2016. *Seeley's Essential Of Anatomy And Physiology: Ninth Edition*. New York: McGraw-Hill Education.
- Verbeckmoes AVS, Dewulf J, Pauw ID, dan Kruif AD, 2004. *Collection and Composition of Cauda Epididymal Plasma in the Bull*, <http://bitnak.ditjennak.deptan.go.id/>; diakses 1 Januari 2017
- Winarsi H, 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*, <http://books.google.co.id/>, diakses 23 Juli 2017).
- Zhang XG, Yan GJ, Hong JY, Su ZZ, Yang SG, Li QW, and Hu JH, 2015. Effects of Bovine Serum Albumin on Boar Sperm Quality During Liquid Storage at 17°C. *Journal Reproduction in Domestic Animals*. 10.